

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-127268

(43)Date of publication of application : 19.05.1998

(51)Int.Cl.

C12M 1/00

C12M 1/22

C12M 1/26

G01N 21/75

G01N 21/78 // C12Q 1/68

(21)Application number : 09-279939

(71)Applicant : BECTON DICKINSON & CO

(22)Date of filing : 26.09.1997

(72)Inventor : COTTINGHAM HUGH V

(30)Priority

Priority number : 96 721372

Priority date : 26.09.1996

Priority country : US

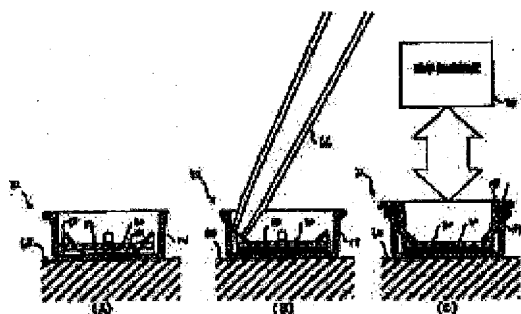
## (54) APPARATUS FOR ASSAY OF LIQUID SAMPLE, APPARATUS FOR DNA AMPLIFICATION ASSAY AND METHOD THEREFORE

(57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide the subject apparatus of a small volume having no head space and free from the occurrence of vaporizing and condensing of a reagent, etc., storing a liquid sample in the apparatus by suctioning it into a capillary section between a sample well and an optical window member and tightly closing it with a closing body.

**SOLUTION:** Into a capillary section 54 between the upper surface of the bottom wall of a sample well 14 and an optical window member 20, a liquid sample 60 is introduced through a gap 58 with a pipette 66, etc., to be suctioned and the sample is tightly closed by

covering with a closing body 18. A reagent in a spot 56, i.e., a dried reagent, which is to be used for homogeneous amplification and fluorescence polarization assay of nucleic acid and adhered on the central position of the upper surface of the bottom wall of the sample well 14, is hydrated to start the objective amplification and assay reactions.



---

## CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] A sample well which is a device which carries out a reaction biological about a liquid sample, or chemical, has the inner part formed by an upright wall surface and the substantially even upward bottom, and receives said liquid sample, An optical window member which separates from said bottom of said sample well, counters this bottom, and forms a capillary tube room between these bottoms and which has the even downward bottom substantially and may be installed in this sample well, A device for liquid sample assay characterized by opening which allows it to introduce said liquid sample into the above-mentioned capillary tube interior of a room, and to be attracted by capillary action in this capillary tube interior of a room, and a thing which seal said opening after said liquid sample is introduced into the above-mentioned capillary tube interior of a room, and for which it closed and had an ingredient.

[Claim 2] The device according to claim 1 characterized by a thing with which it was supported by paries-medialis-orbitae side of said sample well, and for which said optical window member separates as mentioned above, and is held from said bottom of said sample well by a spacer of a piece at least.

[Claim 3] When said optical window member and an inner part of said sample well see from the upper part, they have the same shape substantially, and said opening A periphery edge of the above-mentioned optical window member, The device according to claim 1 existing with a gestalt of a hoop direction gap between paries-medialis-orbitae sides of the above-mentioned sample well which counters this.

[Claim 4] The device according to claim 1 being received by said sample well by said relation to which it closes and an ingredient overlaps said optical window member selectively at least, and sealing said opening.

[Claim 5] The device according to claim 1 having further a reagent made to adhere to this capillary tube interior of a room in order to react to a liquid sample introduced into said capillary tube interior of a room.

[Claim 6] The device according to claim 1 with which it is one of two or more of the same sample wells substantially, and said sample well is characterized by a thing by which it was connected mutually, and for which one of said the optical window members and one of said the openings are provided in each of this sample well.

[Claim 7] DNA amplification and a device for assay which is provided with the following and characterized by being made to adhere to an inside of the above-mentioned capillary tube room that these both dry reagents should react to a biological sample of the above-mentioned liquid state.

A sample well which is a device which carries out nucleic acid amplification homogeneous about a liquid biological sample, and nucleic acid assay, has the inner part formed by an erection wall surface and the substantially even upward bottom, and receives said liquid biological sample.

An optical window member which separates from said bottom of said sample well, counters this bottom, and forms a capillary tube room between these bottoms and which has the even downward bottom substantially and may be installed in this sample well.

An opening which allows it to introduce said liquid living thing carrier sample into the above-mentioned capillary tube interior of a room, and to be attracted by capillary action in this capillary tube interior of a room.

A closing implement which seals said opening after having been received in this opening and introducing said liquid biological sample into the above-mentioned capillary tube interior of a room, [ in a dry reagent for nucleic acid amplification for amplifying arrangement of nucleic acid made into the purpose in a biological sample of the above-mentioned liquid state, and a biological sample of the above-mentioned liquid state ], A dry reagent used for amplified homogeneous nucleic acid assay for displaying so that existence of arrangement of nucleic acid can be detected optically which is made into the purpose.

[Claim 8]A method characterized by comprising the following of carrying out nucleic acid amplification and homogeneous nucleic acid polarization fluorescence assay collectively about a liquid biological sample.

A stage of preparing a sample well which has an even upward bottom inner face substantially.

A stage which inserts an optical window member which has the bottom which it was substantially even and was caudad turned in this sample well.

A stage which detaches the bottom of this optical window member, makes it counter to said bottom inner face of said sample well, holds, and forms a capillary tube room among these both sides.

A stage which introduces a liquid biological sample into this capillary tube interior of a room, and a stage of making a biological sample of the above-mentioned liquid state contacting a dry reagent used for a dry reagent for nucleic acid amplification, and homogeneous nucleic acid polarization fluorescence assay in the above-mentioned capillary tube interior of a room, A stage which seals the above-mentioned capillary tube room, and a stage of allowing a biological sample of the above-mentioned liquid state to react to said nucleic-acid-amplification reagent and said nucleic acid polarization fluorescence assay reagent by maintaining the above-mentioned sample well at prescribed temperature, A stage of letting the above-mentioned optical window member pass, and detecting polarization

fluorescence in a biological sample of the above-mentioned liquid state.

[Claim 9]A method according to claim 8 that said stage of said optical window member being made from material which does not check a penetration of polarization, and detecting polarization fluorescence in said liquid biological sample is characterized by having the stage of drawing polarization through the above-mentioned optical window member.

[Claim 10]A method according to claim 8 that a stage of said optical window member comprising polarization material, and detecting polarization fluorescence in said liquid biological sample is characterized by having the stage of drawing light which does not polarize through the above-mentioned optical window member.

---

[Translation done.]

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[The field of the invention to which an invention belongs] To U.S. patent application 08th under pendency for which Hugh V. Cottingham applied on September 12, 1995 and which was transferred to the applicant of this invention as "amplification of DNA, and assay" / No. 527,253, a Title of invention. The theme relevant to this invention is indicated, and the patent is charged.

The Description of this application is applied as a part of Description of this application by having quoted this application.

[0002] This invention about the instrument and method of performing processing biological about a liquid sample, or chemical, It is related with the device which unified the DNA amplification and assay for performing homogeneous DNA polarization fluorescence assay (homogeneous DNA fluorescence polarization assays) especially.

[0003]

[Description of the Prior Art] The process of the nucleic-acid-probe assay which follows amplification and it of nucleic acid (DNA) is known widely, and is carried out with various gestalten. Although these gestalten are very effective, it is difficult to perform them in a clinical laboratory a little. Generally, DNA probe assay is performed to the sample which was performed until amplification of DNA and the reaction of assay were performed one by one about the sample to assay, namely, the amplification reaction of DNA was completed first, next was amplified thoroughly. This is called terminal point assay (end point assay).

[0004] It is mentioned that DNA (amplifier recon (amplicon)) amplified by the DNA amplification reaction must be physically conveyed in the next DNA probe assay part as one problem accompanying terminal point assay. The environment of a laboratory may be polluted by DNA amplifier recon if this conveyance is performed. The usual danger that it is said that he mistakes a predetermined sample for other samples, or thinks that it is another arises, and this danger increases, whenever physical conveyance of a sample is performed, and it goes.

[0005] A liquid biological sample is accommodated in the inside, and it has succeeded in many proposals which planned the self-accommodation type test program unit that nucleic acid amplification and assay could be collectively performed about this sample. One proposal which adopted the external roller which pushes aside a sample and a detecting reagent through the flexible compartment and passage in a

test program unit among these proposals is looked at by U.S. Pat. No. 5,229,297 to Paul N. Schnipelsky etc. it was alike on July 19, 1994 by Hugh V. Cottingham, applied, and was transferred to the applicant of this invention -- pending in court -- by U.S. patent application 08th / No. 277,553. Another example that the flow of a sample solution object and a reagent solution object is controlled not by a roller but by a centrifugal force is indicated. The fault in both of these proposals is controlling the fluid movement performed inside a test program unit.

It is that the structure of a test program unit becomes more complicated than what is a request grade for how many minutes at this reason.

[0006]A method [ (homogeneous) homogeneous in nucleic acid assay ] is besides the terminal point assay mentioned above. There is no necessity of conveying physically the substance amplified with "it is homogeneous" about the method of nucleic acid assay in this Description to another assay part, and it means that nucleic acid assay is performed simultaneously with an amplification reaction. Therefore, a method homogeneous on account of the simplicity and reliability is liked. Most dangers that it will usually come out that homogeneous assay is performed inside the closed pipe, and those resultants (amplifier recon) will pollute other samples from a certain thing cannot be found. Polarization fluorescence (fluorescence polarization), fluorescence energy movement (fluorescence energy transfer), and an absorbance (light absorbance) are contained in the example of a publicly known homogeneous assay method.

[0007]It is common to use "micro tube (microtube)" made from polypropylene as a reaction vessel in a homogeneous nucleic acid assay method. However, this is unsatisfying for some Reasons. For example, although the capacity of the usual micro tube is 200microL, the volume of the liquid biological sample which should be assayed is usually 50microL thru/or 100microL. Space (known as a "head space") will be left behind above a liquid sample by this, a reaction reagent will evaporate, and it will enter in this space, and then can condense. This is in an inconvenient state and needs to heat the crowning of a tube with a heater from the exterior that condensation should be avoided.

[0008]Since another fault of the conventional micro tube has the chemical action dramatically sensitive to starting temperature which amplifies nucleic acid, before starting a reaction, it is attaining the predetermined minimum temperature. If this condition is not satisfied, the background reaction (background reaction) which is not desirable is made to be generated by what is known as "incorrect preparation (mis-priming)." The requirements for the predetermined minimum temperature for a start are known as "hot start (hot start)."

[0009]On the other hand, when the method of homogeneous assay is dependent on polarization fluorescence, the micro tube made from polypropylene cannot be used,

but must use glass reaction vessels instead. This depends on the fact of stress being made to be generated in the material of a finished part by almost all the plastic working methods, such as injection molding and thermoforming. That is, since these stress has the random polarization effect (polarization effects), it checks the penetration of polarization required for polarization fluorescence assay.

[0010]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]Therefore, the purpose of this invention is to provide the reaction apparatus of small capacity which evaporation and condensation of the reaction reagent which there is no necessity of not having a head space substantially, therefore forming an external heater in the crowning of a device in view of the above, and was accommodated in the device do not produce.

[0011]The further purpose of this invention is by attaining the "hot start" of a nucleic acid amplification reaction to provide the reaction apparatus and method of avoiding the invalid assay result by incorrect preparation.

[0012]Another purpose of this invention has the most in providing the reaction apparatus with which it comprises plastic material on the whole, and \*\* and others also has an optical property required to carry out polarization fluorescence assay.

[0013]It is in providing unified type the nucleic acid amplification and the assay device for which to \*\*, and to accommodate all the reagents that need the further purpose of this invention for the both sides of amplification and assay with the dry gestalt in the device concerned, therefore to add a liquid biological sample for performing nucleic acid assay is only needed.

[0014]The further purpose of this invention is by sealing, after introducing a liquid biological sample to provide unified type the nucleic acid amplification and the assay device which can prevent contamination of the laboratory environment by amplifier recon.

[0015]

[Means for Solving the Problem]According to the desirable embodiment of this invention, inconvenience and restriction in advanced technology are substantially avoided by providing a sample well, an optical window member installed in this sample well, and unified type nucleic acid amplification and an assay instrument which closed and were provided with an ingredient. The above-mentioned optical window member is held in a sample well by a method that a thin capillary tube room is formed between an inner surface of this member, and an inner surface of a sample well which counters this. Dried nucleic acid amplification and an assay reagent are arranged in this capillary tube interior of a room. When using it, a liquid biological sample is attracted by capillary force in the capillary tube interior of a room, next it closes, and a capillary tube room is sealed using an ingredient. In this capillary tube interior of a room, said liquid biological sample can extend in the shape of [ which may be heated comparatively promptly ] a thin layer, therefore

incorrect preparation of an amplification reaction is avoided. It does not require that an optical detection stage is performed via an optical window member, and takes out said liquid sample from a reaction apparatus.

[0016]Therefore, in one mode, this invention relates to a device which carries out a reaction biological about a liquid sample, or chemical. This device is provided with the following.

A sample well which has the inner part formed by an upright wall surface and the substantially even upward bottom.

An optical window member which may be installed in this sample well.

It is substantially even and this optical window member has the bottom turned caudad, and this bottom separates from said bottom of said sample well, counters this bottom, and forms a capillary tube room between these bottoms. An opening for introducing said liquid sample by capillary action is provided in this capillary tube room. After said liquid sample is introduced into said capillary tube interior of a room, a closing implement which seals the above-mentioned opening is also provided.

[0017]In another mode, this invention relates to a device which carries out nucleic acid amplification homogeneous about a liquid biological sample, and nucleic acid assay. This device is provided with the following.

A sample well which has the inner part formed by an upright wall surface and the substantially even upward bottom.

An optical window member which may be installed in this sample well.

It is substantially even and this optical window member has the bottom turned caudad, and this bottom separates from said bottom of a sample well, counters this bottom, and forms a capillary tube room between these bottoms. An opening for introducing a liquid biological sample by capillary action is provided in this capillary tube interior of a room. After said liquid biological sample is introduced into the capillary tube interior of a room, a closing implement which seals the above-mentioned opening is also provided. In order to make it react to a liquid biological sample in the above-mentioned capillary tube interior of a room, inside said capillary tube room, it adheres to a dried reagent which is used for homogeneous nucleic acid amplification and assay.

[0018]In further mode, this invention relates to a method of carrying out nucleic acid amplification and homogeneous nucleic acid polarization fluorescence assay collectively about a liquid biological sample. This method is provided with the following.

A stage of preparing a sample well which has an even upward bottom inner face substantially.

A stage which inserts an optical window member which has the bottom which it was substantially even and was caudad turned in this sample well.



A stage which detaches the bottom of this optical window member, makes it counter to said bottom inner face of said sample well, holds, and forms a capillary tube room among these both sides.

A stage which introduces a liquid biological sample into this capillary tube interior of a room, and a stage of making a biological sample of the above-mentioned liquid state contacting a dry reagent used for a dry reagent for nucleic acid amplification, and homogeneous nucleic acid polarization fluorescence assay in the above-mentioned capillary tube interior of a room, A stage which seals the above-mentioned capillary tube room, and a stage of allowing a liquid biological sample to react to said nucleic-acid-amplification reagent and said nucleic acid polarization fluorescence assay reagent by maintaining the above-mentioned sample well at prescribed temperature, A stage of letting the above-mentioned optical window member pass, and detecting polarization fluorescence in a biological sample of the above-mentioned liquid state.

[0019]If the following detailed explanation is read with attached Drawings, he will be able to understand easily the various purposes, advantages, and the new features of this invention.

[0020]Through and same reference number shows same member or a component for each figure.

[0021]

[Embodiment of the Invention]the multiple well device (multiple-well apparatus) concerning the desirable embodiment of this invention performed in drawing 1 by summarizing amplification of nucleic acid, and processing of assay -- 10 is shown. The device 10 comprises the first coupling frame 12 that comprises eight sample well (sample well) 14 connected, and the second coupling frame 16 that comprises, the eight sealing bodies 18, i.e., the cap, which were connected. It is combined with the sealing body 18 corresponding to self, the optical window member 20 is inserted, and each of the sample well 14 forms a sample well and the assembly 22, and within this assembly, about an individual liquid biological sample, nucleic acid amplification and processing of assay summarize it, and it is performed. If samples fewer than eight are assayed, a user separates this piece 24 of a bond, and although each sample well 14 in the coupling frame 12 is mutually connected with the single tier by the piece 24 of a bond, because it is required, he can divide the coupling frame 12. As illustrated, although each sealing body 18 is connected, the disengageable piece 25 of a bond is used similarly. As for the coupling frame 12 of the sample well 14, it is preferred to fabricate to one by injection molding using proper plastic material, such as polypropylene. The coupling frame 16 of the sealing body 18 can also be formed in a similar way, and forming with the same material is preferred. In this desirable embodiment, each sample well 14 is made into

approximately \*\*\*\*\*, and, as for about 0.320 inch and outside height, about 0.175 inch and wall thickness of an outer diameter are about 0.015 inch. The center-to-center dimension of sample well 14 adjoining comrades (and sealing body 18 adjoining comrades) is about 0.354 inch.

[0022]As shown in drawing 1, the optical window member 20 is inserted in each of the sample well 14, and this has a gestalt of the transparent circular disk supported by two or more ribs 26 estranged to the internal hoop direction of this sample well. The undersurface of each optical window member 20 estranges only a slight distance (preferably about 0.020 inch) from the bottom wall of the corresponding sample well 14 below, and forms the capillary tube room in the pars basilaris ossis occipitalis of this sample well so that it may explain in full detail further. As for this, although the liquid biological sample which should be assayed is introduced into this capillary tube interior of a room, it is preferred to be carried out via annular gap, i.e., opening, which exist between the rim of the optical window member 20 and the vertical paries medialis orbitae of the sample well 14. The reaction of the nucleic acid amplification and the dry reagent for assay which \*(ed), made one of the sealing bodies 18 fit into the sample well 14, blockaded this opening, and were stored by this capillary tube interior of a room, and said liquid biological sample is allowed. After a reaction advances to the point that detection may be started, an optical detection stage is performed, but this is performed through the optical window member 20, without taking out a liquid biological sample from the sealed sample well 14. Thus, the possibility of the cross contamination by other liquid biological samples becomes the minimum thing.

[0023]A detailed structure of the sample well 14 is shown in (A) of drawing 2, (B), and (C). In the illustrated desirable embodiment, each of the sample well 14 was made into the shape of a cylindrical shape, and is provided with the circular top opening 28, the upright cylindrical side attachment wall 30, and the even circular bottom wall 32. At equal intervals, it estranges, the six wedge shape ribs 26, i.e., the spacer, which were turned in the center of this sample well and which cut, wrote and were provided with 36, and it is arranged at the circumference of the inner circumference of the sample well 14. In this desirable embodiment, said rib 26 is supported by the bottom wall 32 of the sample well 14, and it is fabricated by this bottom wall 32 and one at the time of plastic molding. It is cut, written and attached and the rib 26 plays the role which arranges and holds the optical window member 20 in the suitable position in the sample well 14 so that it may describe below.

[0024]The details of the sealing body 18, i.e., a cap, are shown in (A) of drawing 3, (B), and (C). each sealing body 18 -- abbreviated \*\* -- it is annular and has the cylindrical shape side attachment wall, the circular rim 38, i.e., the flange, which were turned up, 40 prolonged caudad, and the circular center opening 42. The lower opening of the opening 42 is surrounded by the truncated-cone-form extension 44

prolonged caudad, this extension 44 is fabricated by the side attachment wall 40 and one, and the taper is attached to the inner direction towards the center shaft heart of the annular sealing body 18. If it explains briefly, when a sample well and the assembly 22 are thoroughly assembled after the liquid biological sample was introduced into the capillary tube interior of a room of the lower part of the optical window member 20, the margo inferior of the extension 44 will contact the edge part of the optical window member 20, and will seal this capillary tube room. This capillary tube room is sealed again also with the annular sealing body ring 46 formed in the surroundings of the lateral part of the cylindrical side attachment wall 40 of the sealing body 18. This sealing body ring 46 carries out friction engagement with the paries-medialis-orbitae side 47 of the sample ((A) and (B) see) well 14, and holds the sealing body 18 to the prescribed position of a sample well. [ of drawing 2 ]

[0025]Before carrying out to (A) of drawing 4, and (B) by summarizing nucleic acid amplification and processing of assay, the method of assembling each of a sample well and the assembly 22 is shown. It is inserted into the sample well 14, and the optical window member 20 was formed in the rib 26 arranged radially, is cut and written, and is caught by 34, and is held. (Although it is not necessarily required, this is performed between manufacturing processes, therefore) When the sample well 14 reaches a user, it is preferred that the optical window member 20 is already attached. Since the plastic material which forms the rib 26 and the sample well 14 fully has flexibility again, When the optical window member 20 cuts and writes and is inserted into 34, the rib 26 bends slightly, or it moves, and the optical window member 20 cuts and writes and, surely it is inserted in 34 with PACHIN. As for the upward field 48 of the rib 26, it is preferred to become a slideway which inclines caudad, cuts and writes with the angle of about 45 degrees to the center of the sample well 14, and draws the edge of the optical window member 20 in 34 as illustrated.

[0026]After the optical window member 20 is inserted into the sample well 14, a liquid biological sample is introduced into the capillary tube interior of a room in which it is located under the optical window member 20, but this is explained below. First, the sealing body 18 is laid on a sample well that a capillary tube room should be blockaded. When the sealing body 18 reaches a prescribed position, the sealing body ring 46 is carrying out wear fitting at the internal side attachment wall 47 of the sample well, and the margo inferior of the extension 44 touches the edge part of the optical window member 20. The sample well and the assembly 22 of an assembly \*\*\*\* state are thoroughly shown in (B) of drawing 4.

[0027](A) of drawing 5 and (B) are the sectional views showing the internal structure of a sample well and the assembly 22, and the sealing body 18 is removed in (A) and they are thoroughly attached in (B). Cut and write the optical window

member 20, it is attached, is held in parallel to the bottom wall 32 of the sample well 14 by the rib 26, and as best shown in (A) of drawing 5. The upward field 50 of the bottom wall 32, Between the downward fields 52 of the optical window member 20 which counter this, the uniform (preferably a height of about 0.020 inch) gap is formed. Along both sides 50 and 52, it is cylindrical, this gap, i.e., space, namely, it forms the capillary tube room 54 of disc shape. In the middle position in this capillary tube room 54, spot (spot) 56 which has a dry reagent used for homogeneous nucleic acid amplification and polarization fluorescence assay has adhered to the above-mentioned field 50. When a liquid biological sample is introduced in the capillary tube room 54, the reagent in the dry spot 56 is again hydrated by this sample, and desired amplification and assay reaction are started. That introduction of the liquid biological sample into the capillary tube room 54 should be permitted the size of the sample well 14 and the optical window member 20, It is considered as \*\*\*\*\* by which about 0.020 inch of annular clearance 58 is formed between the periphery of the optical window member 20, and the paries-medialis-orbitae side 47 of the sample well 14 which counters this. In a desirable embodiment, this makes the inside diameter of the sample well 14 about 0.290 inch, and is attained by forming the outer diameter of the optical window member 20 in about 0.250 inch.

[0028] A sample well and the assembly 22 are thoroughly assembled by (B) of drawing 5, and the state where the liquid biological sample 60 exists in the capillary tube room 54 is shown in it. This liquid biological sample 60 is filling substantially the capillary tube room 54 which has the capacity of about 20microL. \*\*, depend on the above-mentioned bottom wall 32 and the narrow space between each opposed face 50 and 52 of the optical window member 20, and a liquid biological sample is attracted in the chamber 54 by capillary force, and. Height (namely, thickness) spreads at about 0.020 inch, about 0.250 inch in diameter [ the shape of a thin film, i.e., disc-like, ]. In this shape, the liquid biological sample 60 has big surface area as compared with that volume, and balances the temperature of the sample well 14 within about several seconds. In addition, as compared with the volume of a sample, big optical targets (optical target) are realized by having extended the liquid biological sample filmy. This is a convenient thing when performing an optical detection stage like polarization fluorescence assay.

[0029] Probably, signs that the sealing body 18 blockades the above-mentioned capillary tube room 54 will be clear from drawing 5 (B). Namely, in two separate fields, produce the blockade of the capillary tube room 54 and one side, It is formed of the annular contact line between the sealing body ring 46 and the vertical paries-medialis-orbitae side 47 of the sample well 14, and another side is formed of the annular contact line between the margo inferior 62 of the truncated-cone-form extension 44, and the upper surface 64 of the optical window member 20. Here, the liquid biological sample 60 prevents passing through between the

paries-medialis-orbitae side 47 of the sample well 14, and the outer walls 61 of the sealing body 18, and the sealing body ring 46 has played the role which carries out friction maintenance of the sealing body 18 into the sample well 14. The margo inferior 62 of the truncated-cone-form extension 44 provides the seal field of Mr. \*\*\*\* between the sealing body 18 and the optical window members 20, and it has played the role which helps to come in the end of the rib 26 and to hold the optical window member 20 in 34. In addition, a sample well and the assembly 22 provide the opening 42 of the sealing body 18, and the optical course (optical path) which does not have an obstacle to the optical window member 20 at the time of assembly \*\*\*\* thoroughly by this. It becomes possible to carry out the optical detection stage over this sample 60, confining the liquid biological sample 60 in the capillary tube room 54.

[0030](A) of drawing 6, (B), and (C) show how to introduce the liquid biological sample 60 in the capillary tube room 54 of a sample well and the assembly 22. Before introducing the liquid biological sample 60 in the capillary tube room 54, a sample well and the assembly 22 are assembled selectively, but this is performed by coming in the end of the sample well 14, being attached, and inserting the optical window member 20 into the rib 26. As shown in (A) of drawing 6, right above the gap 58 between the periphery of the optical window member 20, and the vertical paries medialis orbitae 47 of the sample well 14, You are made for the opening of the pipette 66 containing the liquid biological sample 60 (the blood sample or other body fluid samples which were prepared in order to have been typically examined to a specific pathogen) which should be assayed to be located. Usually the pipette 66 is made into a disposable type thing, and the support is performed by either a manual pipette device or the automatic (it is robotomorphic) pipette device. Also in any field of the gap 58 neighborhood or case, a pipette device is set, and operates to it that the liquid biological sample 60 should be supplied to the crestal plane of the optical window member 20 from the pipette 66. If this state arises, as shown in (B) of drawing 6, the liquid sample 60 of the measured volume will be automatically attracted by capillary force in the gap 58 and the capillary tube room 54 in which it is located under the optical window member 20. As shown in (C) of drawing 6, the liquid biological sample 60 can be extended to thin film disc-like according to capillary force, and this fills the capillary tube room 54 and loses a head space. As mentioned above, this shape is convenient, but that is because it not only makes efficient heat conduction between the sample well 14 and the liquid sample 60, but big optical targets are given in the continuing detection stage.

[0031]The technique used for them so that the sample well and the assembly 22 constituted according to this invention may process homogeneous nucleic acid amplification and assay to (A) of drawing 7, (B), and (C) to a liquid biological sample is shown. In (A) of drawing 7, the empty sample well 14 which put in the optical

window member 20 and the dry reagent 56 is laid on the heating platen (heating platen) 68. This heating platen 68 is operated that preheating of the sample well 14 should be carried out to a temperature (typically 25 \*\* thru/or 75 \*\*) suitable for processing of homogeneous nucleic acid amplification and assay. This preheating stage carries out temperature, abbreviated \*\*, etc. of the heating platen 68, the empty sample well 14 is in it, and only sufficient time to balance temperature is performed. After this is performed, as shown in (B) of drawing 7, in the capillary tube room 54, the pipette 66 is used and the liquid biological sample 60 is introduced. As for this, as shown in (B) of drawing 7, it is preferred to locate the open end of the pipette 66 right above the gap 58, and to perform it, next to supply the liquid sample 60 directly in the gap 58.

[0032]After the liquid sample 60 fills the capillary tube room 54, the pipette 66 is pulled out and the sealing body 18 is laid in the sample well 14. While hydrating again the nucleic acid amplification in the dry spot 56, and the dry reagent for assay and storing the sample 60 in the capillary tube room 54, homogeneous amplification and an assay reaction produce the liquid biological sample 60. Since this point and the capillary tube room 54 have the big surface area which the biological sample 60 with it contacts, they are heated by even the optimal temperature required for DNA amplification within several seconds after the sample 60 is put in with a pipette in the chamber 54. [ small and height and ] [ liquid ] Therefore, the reagent has already reached the optimal temperature by the time of the dry reagent 56 covering the liquid whole biological sample 60, being dissolved and spread in it, and "preparation (priming)" of DNA amplification starting. Thus, the "hot start" of a DNA amplification reaction is attained. After this "hot start" occurs, holding the heating platen 68 is continued to the temperature (typically 25 \*\* thru/or 75 \*\*) which was suitable for homogeneous amplification and an assay reaction in the liquid biological sample 60. the time of homogeneous amplification and an assay reaction arising -- an optical sensing device (optical detection apparatus) with the suitable advancing state -- it is supervised by 70 in real time. This device 70 detects an optical response or characteristic of the polarization fluorescence of the liquid biological sample 60, fluorescence energy movement, an absorbance, and others according to the character of an assay reaction. The detailed explanation of the device 70 of various types of the microplate fluorometer (microplate fluorometers) etc. which are used for this purpose is unnecessary from publicly known in this industry. U.S. patent application 08th under pendency mentioned above / No. 527,253 are quoted about this point here as what described the special detecting method which may be adopted when assay is a polarization fluorescence type.

[0033]As for the optical window member 20, when being used so that a sample well and the assembly 22 may perform polarization fluorescence assay, it is preferred to make from the transparent material which does not check the penetration of

polarization. As an example of this material, there are cellulose acetate butyrate (CAB; cellulose acetate butyrate), triacetate cellulose (TAC), and glass. Polarization passes such materials and maintains the bias (polarization). If it is a request, a sample well and the assembly 22 can be considered as the thing of the structure which should be used for the confocal (confocal) polarization detection system described by the above-mentioned U.S. pendency application for patent 08th / No. 527,253. In this method, the light polarizer of an excitation beam (excitation beam) is used also as light polarizer of fluorescence emitted from a sample. It becomes possible for it to become unnecessary to arrange a polarization element (polarizing elements) in measuring equipment, and to use a standard microplate fluorometer for polarization fluorescence assay by this. On the other hand, in order to adopt a confocal method, the optical window member 20 is made from polarization material (light-polarizing material), and plays the role which polarizes both the excitation beam from the sensing device 70, and the fluorescence emitted from the liquid biological sample 60. There is a thing which polarization polymer films (polarizing polymeric film), such as polyvinyl alcohol (PVA), have namely, by which they were interposed in the shape of "sandwiches" between CAB, TAC, or glass as an example of polarization material.

[0034]In a desirable embodiment, it is preferred that the latter comprises a polarization fluorescence assay reagent including both of the reagent with which the dry reagent spot 56 is used for the reagent for DNA amplification and homogeneous DNA assay. The example of the suitable reagent for DNA amplification and medicine for DNA polarization fluorescence assay, It is called "polarization fluorescence detection of nucleic acid amplification", and it is indicated by U.S. patent application 08th under pendency for which G.Terrance Walker etc. applied on September 23, 1995 / No. 311,474, and the contents of this application are quoted as some of these Descriptions. The chemical agent in the dry spot 56 is supported in the matrix into which trehalose or other carbohydrates melt easily. These reagents are automatically re-suspended, when exposed to the solution sample introduced in the capillary tube room 54. If it is a request, it will be understood that the dry reagent spot 56 more than a piece is formed in the capillary tube room 54, for example, an amplifying reagent is arranged at one spot, and an assay reagent can be arranged at the spot of another side. However, you have to make it in homogeneous DNA amplification and assay, reagent spot located so that the liquid biological sample 60 may dissolve simultaneously intrinsically (if it dissociates).

[0035]Probably the above-mentioned embodiment will be only what illustrated this invention, and many its alternative devices and methods this invention could not interpret it as being limited to these, and took in this invention to the person skilled in the art will be obvious. Therefore, this invention is defined by said Claims which

also include the equivalent.

---

[Translation done.]



---

## DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

### [Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is an exploded view showing the coupling frame of eight sealing bodies for blockading the coupling frame of eight DNA sample wells and this sample well which collaborate and form a series of sample well and assemblies constituted according to the desirable embodiment of this invention.

[Drawing 2] (A) is a top view of the coupling frame of a DNA sample well, (B) is the sectional side elevation, and (C) is the bottom view.

[Drawing 3] (A) is a top view of the sealing body coupling frame for DNA sample wells, (B) is the sectional side elevation, and (C) is the bottom view.

[Drawing 4] (A) is an exploded view of the DNA sample well and assembly of a piece, and (B) is the assembly state figure.

[Drawing 5] (A) is a decomposition sectional view of the DNA sample well and assembly of the piece in the state where the optical window member was attached, and (B) is the assembly state sectional view.

[Drawing 6] (A), (B), and (C) are the sectional views showing order for the technique of introducing a liquid biological sample with a pipette in the DNA sample well and assembly assembled selectively later on.

[Drawing 7] (A), (B), and (C) are the sectional views showing order for the technique of performing nucleic acid amplification and homogeneous nucleic acid polarization fluorescence assay using the DNA sample well and assembly of this invention to which the dry reagent was made to adhere in the reaction region later on.

### [Description of Notations]

10 Multiple well device

12 The first coupling frame

14 Sample well

16 The second coupling frame

18 Sealing body

20 Optical window member

22 A sample well and an assembly

24 The piece of a bond

25 The piece of a bond

26 Rib

28 Top opening

30 Cylindrical side attachment wall

32 Circular bottom wall

36 Come in the end.

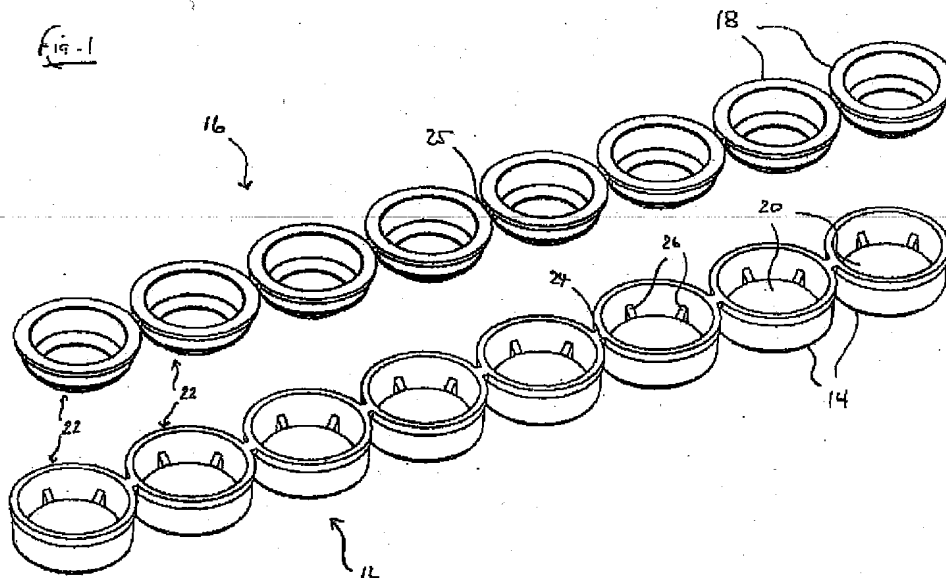
38 Flange  
40 Cylindrical shape side attachment wall  
42 Center opening  
44 Truncated-cone-form extension  
46 Sealing body ring  
47 Paries-medialis-orbitae side  
48 An upward field  
50 An upward field  
52 A downward field  
54 Capillary tube room  
56 Dry reagent  
58 Annular clearance  
60 A liquid biological sample  
61 Outer wall  
62 Margo inferior  
64 Upper surface  
66 Pipette  
68 Heating platen  
70 Optical sensing device

---

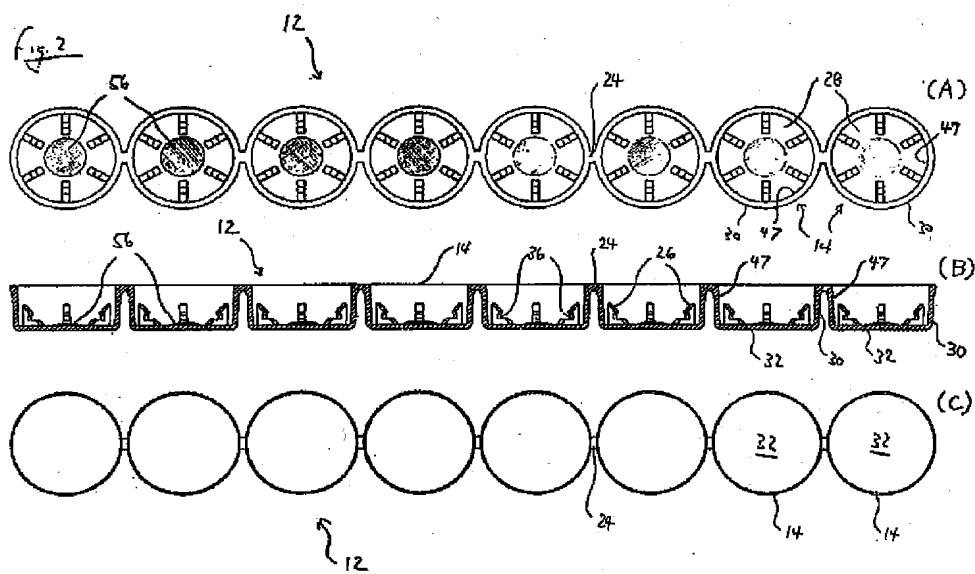
[Translation done.]

# DRAWINGS

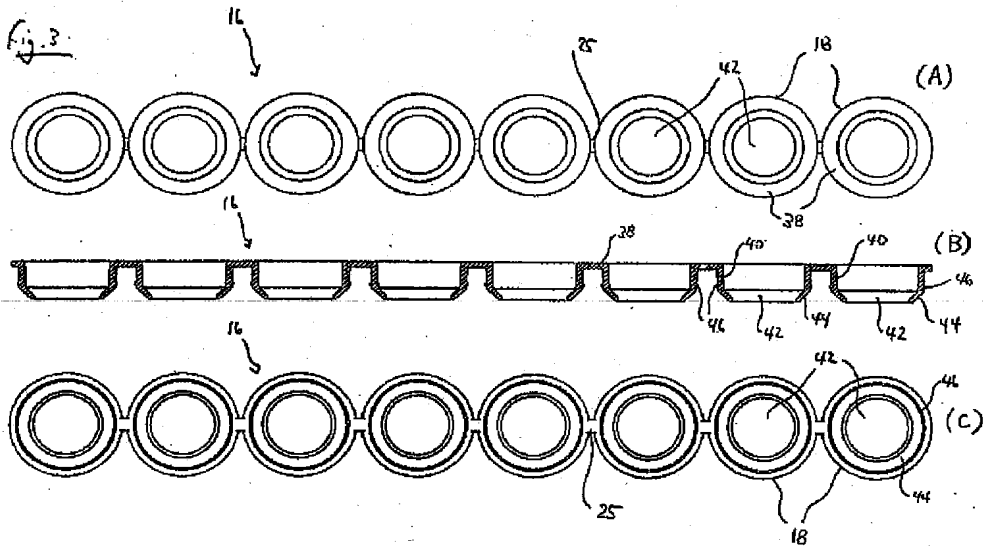
[Drawing 1]



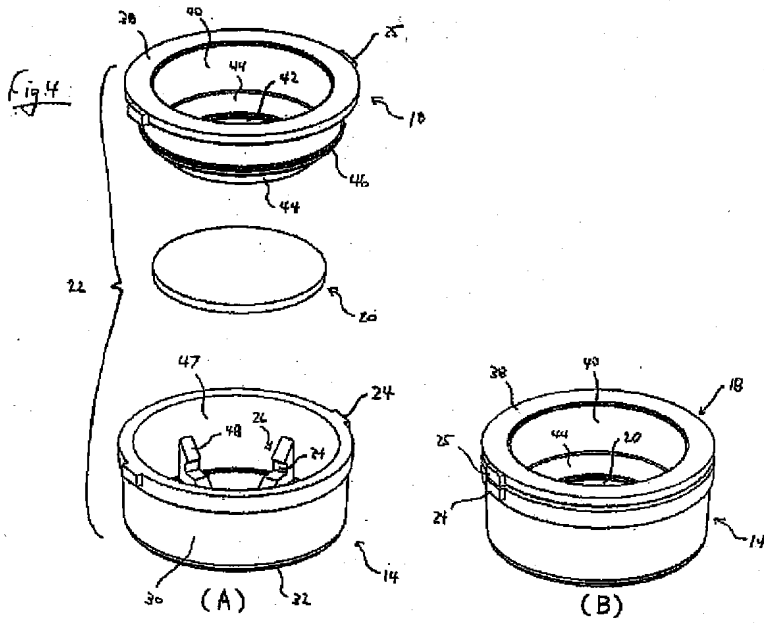
[Drawing 2]



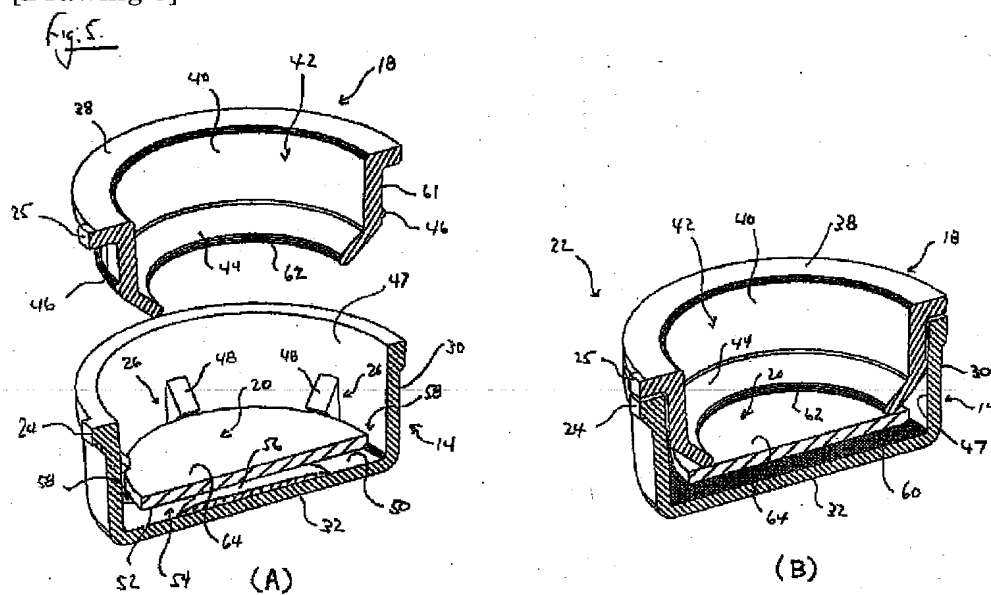
[Drawing 3]



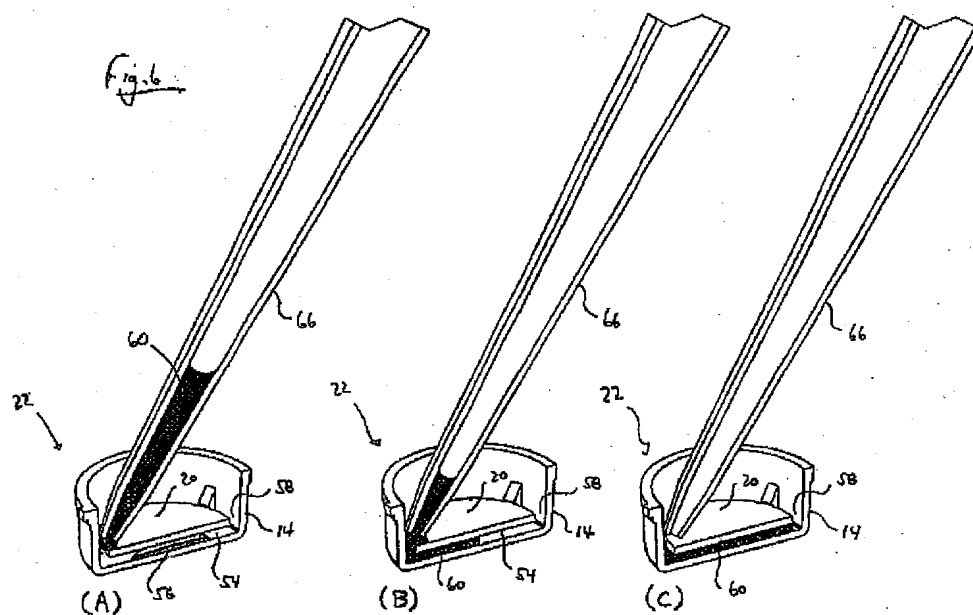
[Drawing 4]



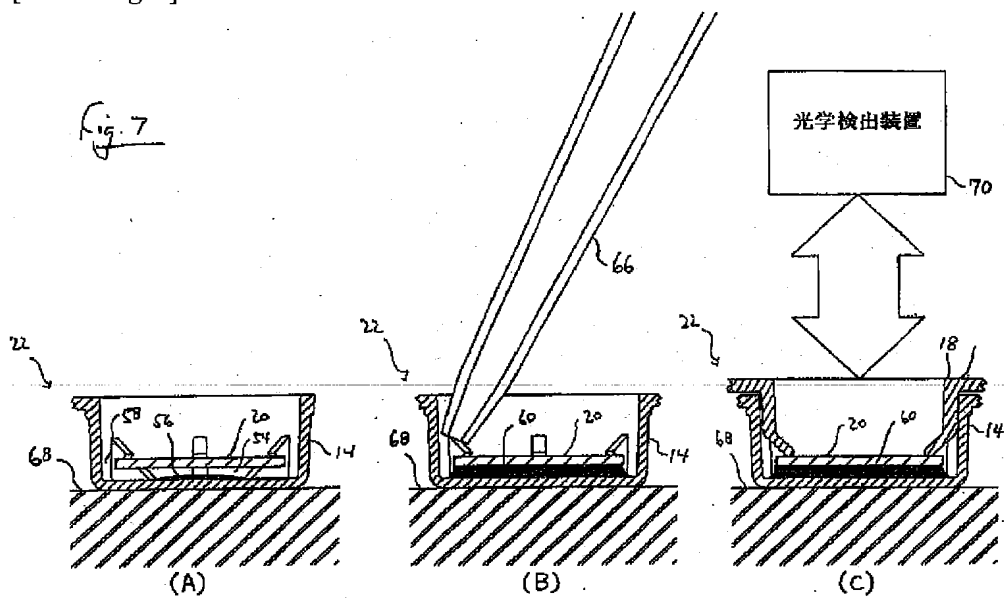
[Drawing 5]



[Drawing 6]



[Drawing 7]



[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-127268

(43) 公開日 平成10年(1998) 5月19日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

C 1 2 M 1/00

C 1 2 M 1/00

A

1/22

1/22

1/26

1/26

G 0 1 N 21/75

G 0 1 N 21/75

Z

21/78

21/78

C

審査請求 未請求 請求項の数10 F D (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平9-279939

(22) 出願日

平成9年(1997) 9月26日

(31) 優先権主張番号

08/721, 372

(32) 優先日

1996年9月26日

(33) 優先権主張国

米国 (US)

(71) 出願人 591007332

ベクトン・ディッキンソン・アンド・カン  
パニー

BECTON DICKINSON AN  
D COMPANY

アメリカ合衆国ニュージャージー州07417  
-1880, フランクリン・レイクス, ワン・  
ベクトン・ドライブ (番地なし)

(72) 発明者 ヒュー・ヴィ・コッティンガム

アメリカ合衆国ニュージャージー州07006,  
コールドウェル, マウンテン・アヴェニュー  
49

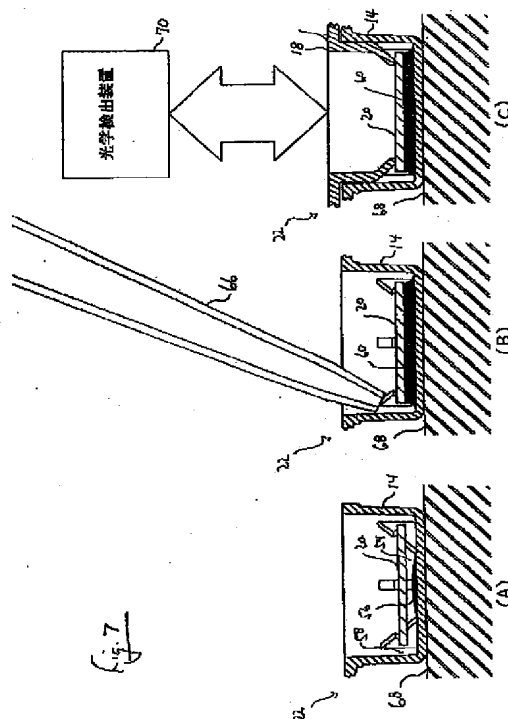
(74) 代理人 弁理士 奥山 尚男 (外3名)

(54) 【発明の名称】 液体試料アッセイ用装置、並びにDNA増幅・アッセイ用装置及び同方法

(57) 【要約】

【課題】 液体状の生物学的試料について核酸増幅および核酸アッセイをまとめて行う装置を提供する。

【解決手段】 サンプル・ウェル (14) 内で対向し、かつ離間された、光学的窓部材 (20) の表面 (52) とサンプル・ウェル (14) の表面 (50) とは毛管室 (54) を画成し、該毛管室 (54) の中に液体状の生物学的試料 (60) が毛管力により吸引される。前記液体状の生物学的試料 (60) を前記毛管室 (54) 内で薄膜状に拡げることによりヘッドスペースが無くなり、前記試料への熱伝導が最大化され、かつ、大寸の光学ターゲットが達成されてアッセイの検出段階を容易なものとする。開示された装置は、ホモジニアスな核酸増幅および蛍光偏光アッセイに特に適しているが、他のタイプの生物学プロセスおよび化学プロセスに関しても使用され得る。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 液体試料について生物学的な或は化学的な反応を実施する装置であって、直立した側壁面と実質的に平らな上向きの底面とにより画成された内側部分を有して前記液体試料を受容するサンプル・ウェルと、

前記サンプル・ウェルの前記底面から離れて該底面に対向して該底面との間に毛管室を画成する実質的に平らで下向きの底面を有し、該サンプル・ウェル内に設置され得る光学的窓部材と、

前記液体試料が上記毛管室内に導入され該毛管室内に毛管作用により吸引されることを許す開口と、

上記毛管室内に前記液体試料が導入された後に前記開口を密封する閉じ具とを備えたことを特徴とする液体試料アッセイ用装置。

【請求項2】 前記サンプル・ウェルの内側壁面により担持された少なくとも一個のスペーサにより、前記光学的窓部材が前記サンプル・ウェルの前記底面から前記のように離れて保持されることを特徴とする、請求項1に記載の装置。

【請求項3】 前記光学的窓部材と前記サンプル・ウェルの内側部分とが、上方から見たときに実質的に同一の形状を有し、且つ、前記開口が、上記光学的窓部材の外周縁と、これに対向する、上記サンプル・ウェルの内側壁面との間の周方向間隙の形態で存在することを特徴とする、請求項1に記載の装置。

【請求項4】 前記閉じ具が、前記光学的窓部材と少なくとも部分的に重なり合う関係で前記サンプル・ウェルに受容されて前記開口を密閉することを特徴とする、請求項1に記載の装置。

【請求項5】 前記毛管室内に導入される液体試料と反応する為に該毛管室内に付着させられた試薬を更に備えたことを特徴とする、請求項1に記載の装置。

【請求項6】 前記サンプル・ウェルが、相互に連結された実質的に同一な複数個のサンプル・ウェルのひとつであり、該サンプル・ウェルの各々には、前記光学的窓部材のひとつ及び前記開口のひとつが設けられていることを特徴とする、請求項1に記載の装置。

【請求項7】 液体状の生物学的試料についてホモジニアスな核酸増幅および核酸アッセイを実施する装置であって、

直立側壁面と実質的に平らな上向きの底面とにより画成された内側部分を有して前記液体状の生物学的試料を受容するサンプル・ウェルと、

前記サンプル・ウェルの前記底面から離れて該底面に対向して該底面との間に毛管室を画成する実質的に平らで下向きの底面を有し、該サンプル・ウェル内に設置され得る光学的窓部材と、

前記液体状の生物学的試料が上記毛管室内に導入され該

毛管室内に毛管作用により吸引されることを許す開口と、

該開口内に受容されて、上記毛管室内に前記液体状の生物学的試料が導入された後に前記開口を密封する閉じ具と、

上記液体状の生物学的試料内の、目的とする、核酸の配列を増幅するための核酸増幅用乾燥試薬と、上記液体状の生物学的試料内において、増幅された、目的とする、核酸の配列の存在を光学的に検出し得るように表示するための、ホモジニアスな核酸アッセイに用いる乾燥試薬とを備え、これら両乾燥試薬が上記液体状の生物学的試料と反応すべく上記毛管室の内部に付着させられたことを特徴とするDNA増幅・アッセイ用装置。

【請求項8】 液体状の生物学的試料について核酸増幅およびホモジニアスな核酸蛍光偏光アッセイをまとめて実施する方法であって、

実質的に平らで上向きの底部内面を有するサンプル・ウェルを準備する段階と、

該サンプル・ウェル内に、実質的に平らであると共に下方に向けられた底面を有する光学的窓部材を挿入する段階と、

該光学的窓部材の底面を、前記サンプル・ウェルの前記底部内面に対し、離して対向させ保持してこれら両面間に毛管室を画成する段階と、

該毛管室内に液体状の生物学的試料を導入する段階と、上記液体状の生物学的試料を、上記毛管室内において核酸増幅用乾燥試薬およびホモジニアスな核酸蛍光偏光アッセイに用いる乾燥試薬に接触せしめる段階と、

上記毛管室を密封する段階と、

上記サンプル・ウェルを所定温度に保つことにより上記液体状の生物学的試料が前記核酸増幅試薬および前記核酸蛍光偏光アッセイ試薬と反応するのを許す段階と、上記光学的窓部材を通して上記液体状の生物学的試料内における蛍光偏光を検出する段階とを有するDNA増幅・アッセイ用方法。

【請求項9】 前記光学的窓部材が、偏光の透過を阻害しない材料で作られ、且つ、

前記液体状の生物学的試料内における蛍光偏光を検出する前記段階が、偏光を上記光学的窓部材を通して導く段階を有することを特徴とする、請求項8に記載の方法。

【請求項10】 前記光学的窓部材が偏光材料から成り、且つ、

前記液体状の生物学的試料内における蛍光偏光を検出する段階が、偏光されていない光を、上記光学的窓部材を通して導く段階を有することを特徴とする、請求項8に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する利用分野】 発明の名称を「DNAの増幅およびアッセイ」として、Hugh V. Cottinghamにより19

10

20

30

40

50



95年9月12日付で出願され本発明の出願人に譲渡された係属中の米国特許出願第08/527,253号には、本発明と関連する主題が開示され、かつ特許が請求されており、該出願を引用したことにより該出願の明細書を本願明細書の一部として援用する。

【0002】本発明は、液体試料について生物学的なあるいは化学的な処理を行う器具および方法に関し、特に、ホモジニアスなDNA蛍光偏光アッセイ(homogeneous DNA fluorescence polarization assays)を行うための、DNA増幅・アッセイを統合した装置に関する。

【0003】

【従来の技術】核酸(DNA)の増幅およびそれに引続く核酸プローブアッセイのプロセスは広く知られており、種々の形態で実施される。これらの形態は極めて有効ではあるが、それらを臨床検査室で行うことは幾分難しい。一般に、DNAの増幅およびアッセイの反応は、アッセイする試料について順次に行われ、すなわち、先ずDNAの増幅反応が完了するまで行われ、次に、完全に増幅された試料に対してDNAプローブアッセイが行われる。これは、終点アッセイ(end point assay)と称される。

【0004】終点アッセイに伴うひとつの問題点としては、DNA増幅反応により増幅されたDNA(アンプリコン(amplicon))を次のDNAプローブアッセイ箇所へ物理的に搬送せねばならないことが挙げられる。この搬送を行うと、DNAアンプリコンによって実験室の環境が汚染される可能性がある。更に、所定の試料を他の試料と取り違えたり別のものだと思ったりするというような通常的な危険性が生じ、この危険性は試料の物理的な搬送が行われる度に増大して行く。

【0005】又、液体状の生物学的試料をその内部に収容すると共に、該試料について核酸増幅およびアッセイをまとめて行い得るという自己収容型のテストユニットを企図した多くの提案が為されてきた。斯かる提案の中で、テストユニット内の可撓性区画および通路を通して試料および検出試薬を押しやる外部ローラを採用したひとつの案が、Paul N. Schnipelsky ほかに対する米国特許第 5,229,297号に見られる。更に、Hugh V. Cottinghamにより1994年7月19日付で出願され、本発明の出願人に譲渡された係属中の米国特許出願第08/277,553号によって、試料液体と試薬液体との流れがローラではなく遠心力により制御されるという別の例が開示されている。これらの提案の両者における欠点は、テストユニットの内部で行われる流体移動を制御する必要があることであり、この故に、テストユニットの構造が所望程度のものより幾分複雑になることである。

【0006】上述した終点アッセイのほかに、核酸アッセイのホモジニアス(homogeneous)な方法も在る。本明細書中で、核酸アッセイの方法に関し、「ホモジニアスな」とは、増幅された物質を別のアッセイ箇所まで物理

的に搬送する必要が無く、核酸アッセイが増幅反応と同時に行われることを意味する。従って、その簡素さおよび信頼性の故に、ホモジニアスな方法は好まれる。更に、ホモジニアスなアッセイは、閉じられた管の内部で行われるのが通常であることから、それらの反応生成物(アンプリコン)が他の試料を汚染する危険性は殆ど無い。公知のホモジニアスなアッセイ方法の例には、蛍光偏光(fluorescence polarization)、蛍光エネルギー移動(fluorescence energy transfer)および吸光度(light absorbance)が含まれる。

【0007】ホモジニアスな核酸アッセイ方法では、反応容器としてポリプロピレン製の「マイクロチューブ(microtube)」を使用するのが一般的である。但し、これは幾つかの理由により、満足できるものではない。例えば、通常のマイクロチューブの容量は200 $\mu$ Lであるが、アッセイすべき液体状の生物学的試料の体積は通常は50 $\mu$ Lないし100 $\mu$ Lである。このことにより、液体試料の上方に(「ヘッドスペース」として知られている)空間が残され、反応試薬が気化してこの空間内に入り次に凝縮し得ることとなる。これは不都合な状態であり、また、凝縮を回避すべくチューブの頂部を外部からヒータで加熱する必要がある。

【0008】従来のマイクロチューブの別の欠点は、核酸を増幅する化学作用が開始温度に非常に敏感であることから、反応を開始する前に所定の最低温度を達成する必要があることである。もしこの条件が満足されなければ、「誤準備(mis-priming)」として知られているものにより、望ましくないバックグラウンド反応(background reaction)が生ぜしめられることになる。開始用の所定の最低温度の要件は、「ホットスタート(hot start)」として知られている。

【0009】一方、ホモジニアスなアッセイの方法が蛍光偏光に依存する場合、ポリプロピレン製のマイクロチューブは使用できず、ガラス製の反応容器を代りに用いねばならない。これは、射出成形および熱成形などの殆どのプラスチック加工方法では完成部品の材料内に応力が生ぜしめられるという事実に依るものである。即ち、これらの応力は、ランダムな偏光効果(polarization effects)を有するので、蛍光偏光アッセイに必要な偏光の透過を阻害するのである。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、上記に鑑み、ヘッドスペースを実質的に有せず、故に装置の頂部に外部ヒータを設ける必要が無く、且つ、装置内に収容された反応試薬の気化および凝縮が生じない、小容量の反応装置を提供するにある。

【0011】本発明の更なる目的は、核酸増幅反応の「ホットスタート」を達成することにより、誤準備による無効なアッセイ結果を回避し得る反応装置および方法を提供するにある。

10

20

30

40

50

【0012】本発明の別の目的は、その大部分が全体的にプラスチック材料で構成され乍らも、蛍光偏光アッセイを実施するに必要な光学特性を有する反応装置を提供するにある。

【0013】而して、本発明の更なる目的は、増幅およびアッセイの双方に必要な試薬の全てが当該装置内に乾燥形態で収容されており、従って、核酸アッセイを行うには液体状の生物学的試料を加えることだけが必要とされる、統合型の核酸増幅・アッセイ装置を提供するにある。

【0014】本発明の更なる目的は、液体状の生物学的試料を導入した後に密閉することにより、アンプリコンによる実験室環境の汚染を防止し得る統合型の核酸増幅・アッセイ装置を提供するにある。

#### 【0015】

【課題を解決するための手段】本発明の好ましい実施形態によれば、サンプル・ウェルと、該サンプル・ウェル内に設置される光学の窓部材と、閉じ具とを備えた統合型の核酸増幅・アッセイ器具を提供することにより、先行技術における不都合および制限が実質的に回避される。上記光学の窓部材は、該部材の内側表面と、これに対向する、サンプル・ウェルの内側表面との間に薄い毛管室が画成される様な仕方でサンプル・ウェル内に保持される。又、乾燥された核酸増幅・アッセイ試薬が、該毛管室内に配備される。使用に際し、液体状の生物学的試料が毛管力により毛管室内に吸引され、次に、閉じ具を用いて毛管室が密閉される。該毛管室内では、前記液体状の生物学的試料が比較的迅速に加熱され得る薄層状に拡げられ、従って、増幅反応の誤準備が回避される。更に、光学検出段階は光学の窓部材を介して行われ、前記液体試料を反応装置から取出すことを要しない。

【0016】従って、ひとつの態様において、本発明は液体試料について生物学的な或は化学的な反応を実施する装置に関する。該装置は、直立した側壁面と実質的に平らな上向きの底面とにより画成された内側部分を有するサンプル・ウェルと、該サンプル・ウェル内に設置され得る光学の窓部材とを備えている。実質的に平らであり、かつ、下方に向けられた底面を該光学の窓部材は有し、該底面が前記サンプル・ウェルの前記底面から離れて該底面に対向して該底面との間に毛管室を画成する。この毛管室に毛管作用により前記液体状試料を導入するための開口が設けられる。又、前記毛管室内に前記液体試料が導入された後に上記開口を密封する閉じ具も提供される。

【0017】別の態様において、本発明は、液体状の生物学的試料についてホモジニアスな核酸増幅および核酸アッセイを実施する装置に関する。該装置は、直立した側壁面と実質的に平らな上向きの底面とにより画成された内側部分を有するサンプル・ウェルと、該サンプル・ウェル内に設置され得る光学の窓部材とを備えてい

る。実質的に平らであると共に下方に向けられた底面を該光学の窓部材は有し、該底面がサンプル・ウェルの前記底面から離れて該底面に対向して該底面との間に毛管室を画成する。この毛管室内に毛管作用により液体状の生物学的試料を導入する為の開口が設けられる。又、毛管室内に前記液体状の生物学的試料が導入された後に上記開口を密封する閉じ具も提供される。更に、上記毛管室内で液体状の生物学的試料と反応させるために、前記毛管室の内部には、ホモジニアスな核酸増幅・アッセイに用いる乾燥された試薬が付着されている。

【0018】更なる態様において、本発明は、液体状の生物学的試料について核酸増幅およびホモジニアスな核酸蛍光偏光アッセイをまとめて実施する方法に関する。該方法は、実質的に平らで上向きの底部内面を有するサンプル・ウェルを準備する段階と、該サンプル・ウェル内に、実質的に平らであると共に下方に向けられた底面を有する光学の窓部材を挿入する段階と、該光学の窓部材の底面を、前記サンプル・ウェルの前記底部内面に対し、離して対向させ保持してこれら両面間に毛管室を画成する段階と、該毛管室内に液体状の生物学的試料を導入する段階と、上記液体状の生物学的試料を、上記毛管室内において核酸増幅用乾燥試薬およびホモジニアスな核酸蛍光偏光アッセイに用いる乾燥試薬に接触せしめる段階と、上記毛管室を密封する段階と、上記サンプル・ウェルを所定温度に保つことにより液体状の生物学的試料が前記核酸増幅試薬および前記核酸蛍光偏光アッセイ試薬と反応するのを許す段階と、上記光学の窓部材を通して上記液体状の生物学的試料内における蛍光偏光を検出する段階とを有する。

【0019】本発明の種々の目的、利点および新規な特徴は、添付の図面と共に以下の詳細な説明を読めば容易に理解できるであろう。

【0020】尚、各図を通し、同様の参照番号は同様の部材、或は構成要素を示している。

#### 【0021】

【発明の実施の形態】図1には、核酸の増幅およびアッセイの処理をまとめて行う、本発明の好ましい実施形態に係るマルチプル・ウェル装置(multiple-well apparatus) 10が示されている。装置10は、連結された8個のサンプル・ウェル(sample well) 14から成る第一の連結体12と、連結された8個の密封体すなわちキャップ18から成る第二の連結体16とから成る。サンプル・ウェル14の各々は、自身に対応する密封体18と組み合わせられ光学の窓部材20が挿入されてサンプル・ウェル・組立体22を形成し、該組立体内で、個別の液体状の生物学的試料について核酸増幅およびアッセイの処理がまとめて行われる。連結体12中の個々のサンプル・ウェル14はつなぎ片24により一列に相互に連結されているが、八つより少ない試料をアッセイするのであれば、使用者は該つなぎ片24を切り離して連結体12

を必要なだけに分割することが出来る。図示された様に、各密封体18を連結するのにも、同様に分離可能なつなぎ片25が使用されている。サンプル・ウェル14の連結体12は、ポリプロピレン等の適宜なプラスチック材料を用いて射出成形により一体に成形するのが好ましい。又、密封体18の連結体16も同様の方法で形成することが可能であり、同じ材料で形成するのが好ましい。この好ましい実施形態において、個々のサンプル・ウェル14は略々円筒形状とされており、外径は約0.320インチ、外側高さは約0.175インチ、壁厚は約0.015インチである。更に、隣接するサンプル・ウェル14同士（および隣接する密封体18同士）の中心間距離は、約0.354インチである。

【0022】図1に示されるように、サンプル・ウェル14の各々には光学の窓部材20が挿入され、これは、該サンプル・ウェルの内部周方向に離間した複数個のリップ26により支持された透明の円形ディスクの形態を有する。以下に更に詳述する様に、各光学の窓部材20の下面は、対応するサンプル・ウェル14の底壁から僅かな距離（好ましくは約0.020インチ）だけ離間し、該サンプル・ウェルの底部内に毛管室を形成している。アッセイすべき液体状の生物学的試料は該毛管室内に導入されるが、これは、光学の窓部材20の外縁とサンプル・ウェル14の垂直内側壁との間に存在する環状の間隙すなわち開口を介して行われるのが好ましい。而して、密封体18のひとつをサンプル・ウェル14に嵌合させてこの開口を閉塞し、該毛管室内に収納された、核酸増幅およびアッセイ用の乾燥試薬と前記液体状の生物学的試料との反応が許される。検出が開始され得る点まで反応が進行した後に光学の検出段階が行われるが、これは、密閉されたサンプル・ウェル14から液体状の生物学的試料を取り出すこと無く、光学の窓部材20を通して行われる。この様にして、他の液体状の生物学的試料による相互汚染の可能性は最小限度のものとなる。

【0023】図2の（A）、（B）および（C）には、サンプル・ウェル14の詳細な構造が示されている。図示された好ましい実施形態において、サンプル・ウェル14の各々は略々円筒形状とされ、円形の頂部開口28、直立した円筒状側壁30、および、平らな円形底壁32を備えている。サンプル・ウェル14の内周回りには、該サンプル・ウェルの中央に向けられた切りかき36を備えた、6個の楔形状リップすなわちスペーサ26が等間隔に離間して配置されている。この好ましい実施形態において、前記リップ26はサンプル・ウェル14の底壁32により担持されると共に、プラスチック成形時に該底壁32と一体に成形されている。以下に記述する様に、切りかき付きリップ26は、光学の窓部材20をサンプル・ウェル14内の適切な位置に配置して保持する役割を果たすものである。

【0024】図3の（A）、（B）および（C）には、

密封体すなわちキャップ18の詳細が示されている。各密封体18は略々環状であり、上方に向けられた円形リムすなわちフランジ38、下方に延びた円筒形側壁40、および、円形の中央開口部42を備えている。開口部42の下側開口は、下方に延びた円錐台状延長部44により囲繞されており、該延長部44は、側壁40と一体に成形され、環状の密封体18の中央軸心に向けて内方ヘテーパが付けられている。簡単に説明すると、延長部44の下縁は、光学の窓部材20の下方の毛管室内に液体状の生物学的試料が導入された後にサンプル・ウェル・組立体22が完全に組立てられたときに光学の窓部材20の周縁部と接触して該毛管室を密閉する。この毛管室はまた、密封体18の円筒状側壁40の外側部の回りに形成された環状の密封体リング46によっても密閉される。この密封体リング46は、（図2の（A）および（B）に見られる）サンプル・ウェル14の内側壁面47と摩擦係合して、密封体18をサンプル・ウェルの所定位置に保持している。

【0025】図4の（A）および（B）には、核酸増幅およびアッセイの処理をまとめて行う前にサンプル・ウェル・組立体22の各々を組立てる方法が示されている。光学の窓部材20はサンプル・ウェル14内に挿入されると共に、半径方向に配置されたリップ26に形成された切りかき34により受止められ、かつ保持される。

（必ずしも必要ではないが、このことは、製造工程の間に行われ、従って、サンプル・ウェル14が使用者に届くときには光学の窓部材20が既に組付けられているのが好適である。）又、リップ26およびサンプル・ウェル14を形成するプラスチック材料が十分に可撓性を有するので、光学の窓部材20が切りかき34内に挿入されるときにリップ26が僅かに撓曲し、或は動いて、光学の窓部材20が切りかき34にパチンと確かに嵌め込まれる。リップ26の上向き面48は、図示された様にサンプル・ウェル14の中心に対し約45°の角度で下方に傾斜し、切りかき34内に光学の窓部材20の縁部を導く案内面となるのが好ましい。

【0026】光学の窓部材20がサンプル・ウェル14内に挿入された後、光学の窓部材20の下方に位置する毛管室内に液体状の生物学的試料が導入されるが、これを以下に説明する。まず、密封体18は毛管室を閉塞すべくサンプル・ウェル上に載置される。密封体18が所定位置に届いたとき、密封体リング46がサンプル・ウェルの内部側壁47に摩擦係合しており、かつ、延長部44の下縁が光学の窓部材20の周縁部に接触している。図4の（B）には、完全に組立てられた状態のサンプル・ウェル・組立体22が示されている。

【0027】図5の（A）および（B）は、サンプル・ウェル・組立体22の内部構造を示す断面図であり、密封体18が（A）においては取り外されており、（B）においては完全に取付けられている。図5の（A）に最

10

20

30

40

50

も良く示されているように、光学的窓部材20は切りかき付きリブ26によりサンプル・ウェル14の底壁32に対して平行に保持され、底壁32の上向き面50と、これに対向する、光学的窓部材20の下向き面52との間には(好ましくは約0.020インチの高さの)均一な間隙が形成されている。この間隙すなわち空間は、両面50、52間に円柱状の、すなわち円板形状の毛管室54を形成する。この毛管室54内の中央位置において、上記の面50には、ホモジニアスな核酸増幅・蛍光偏光アッセイに用いる乾燥試薬を有するスポット(spot)56が付着している。液体状の生物学的試料が毛管室54内に導入されたとき、乾燥スポット56内の試薬はこの試料により再び水和され、所望の増幅およびアッセイ反応が開始される。毛管室54内への液体状の生物学的試料の導入を許容すべく、サンプル・ウェル14および光学的窓部材20の寸法は、光学的窓部材20の外周と、これに対向する、サンプル・ウェル14の内側壁面47との間に約0.020インチの環状間隙58が形成される如きものとされる。このことは、好ましい実施形態において、サンプル・ウェル14の内径を約0.290インチとし、光学的窓部材20の外径を約0.250インチに形成することで達成される。

【0028】図5の(B)には、サンプル・ウェル・組立体22が完全に組立てられ、毛管室54内に液体状の生物学的試料60が存在する状態が示されている。この液体状の生物学的試料60は、約20 $\mu$ Lの容積を有する毛管室54を実質的に満たしている。而して、上記底壁32および光学的窓部材20の夫々の対向面50および52の間の狭幅の空間に依り、液体状の生物学的試料は毛管力によりチャンバ54内に吸引されると共に、高さ(すなわち厚さ)が約0.020インチで直径が約0.250インチの薄膜状にすなわち円板状に拡がる。この形状において、液体状の生物学的試料60はその体積に比して大きな表面積を有し、かつ、およそ数秒以内にサンプル・ウェル14の温度と平衡する。これに加え、液体状の生物学的試料を薄膜状に広げたことにより、試料の体積に比して大きな光学的ターゲット(optical target)が実現される。このことは、蛍光偏光アッセイの様な光学検出段階を行うときに好都合なことである。

【0029】上記毛管室54を密封体18が閉塞する様子は図5(B)から明らかであろう。即ち、毛管室54の閉塞は2個の別個の領域で生じ、一方は、密封体リング46とサンプル・ウェル14の垂直な内側壁面47との間の環状接触ラインにより形成され、他方は、円錐台状延長部44の下縁62と光学的窓部材20の上面64との間の環状接触ラインにより形成されている。ここで、密封体リング46は、液体状の生物学的試料60がサンプル・ウェル14の内側壁面47と密封体18の外壁61との間を通過することを阻止すると共に、密封体

18をサンプル・ウェル14内に摩擦保持する役割を果たしている。又、円錐台状延長部44の下縁62は、密封体18と光学的窓部材20との間に同様の密封領域を提供すると共に、光学的窓部材20をリブ26の切りかき34内に保持するのを助ける役割を果たしている。これに加え、密封体18の開口部42は、サンプル・ウェル・組立体22が完全に組立てられたときに光学的窓部材20に対して障害物の無い光学経路(optical path)を提供し、このことにより、液体状の生物学的試料60を毛管室54に閉じ込めたまま、該試料60に対する光学検出段階を実施することが可能となる。

【0030】図6の(A)、(B)および(C)は、サンプル・ウェル・組立体22の毛管室54内に液体状の生物学的試料60を導入する方法を示している。毛管室54内に液体状の生物学的試料60を導入する前に、サンプル・ウェル・組立体22は部分的に組立てられるが、これは、光学的窓部材20をサンプル・ウェル14の切りかき付きリブ26内に挿入することで行われる。図6の(A)に示された如く、光学的窓部材20の周縁とサンプル・ウェル14の垂直な内側壁47との間の間隙58の直上に、アッセイされるべき液体状の生物学的試料60(典型的には、特定の病原体に対して試験されるべく調製された血液試料もしくは他の体液試料)を含むピペット66の開口が位置せしめられる。ピペット66は使い捨てタイプのものであるのが通常であり、また、その担持は手動ピペット装置もしくは自動的な(ロボットの)ピペット装置のいずれかにより行われる。いずれの場合にも、ピペット装置は、間隙58付近の領域において光学的窓部材20の頂面にピペット66から液体状の生物学的試料60を供給すべく作動する。この状態が生ずると、図6の(B)に示された様に、計量された体積の液体状試料60は、間隙58内と、光学的窓部材20の下方に位置する毛管室54内とに毛管力により自動的に吸引される。又、図6の(C)に示された様に、毛管力により液体状の生物学的試料60は薄膜円板状に拡げられ、これが毛管室54を満たしてヘッドスペースを無くする。上述した如く、この形状は好都合なものであるが、それは、サンプル・ウェル14と液体試料60との間の熱伝導を効率的にするだけでなく、引続く検出段階において大きな光学的ターゲットを与えるからである。

【0031】図7の(A)、(B)および(C)には、本発明に従って構成されたサンプル・ウェル・組立体22が、液体状の生物学的試料に対してホモジニアスな核酸増幅・アッセイの処理を行うべく使用される手法が示されている。図7の(A)においては、光学的窓部材20と乾燥試薬56とを入れた空のサンプル・ウェル14が加熱プラテン(heating platen)68上に載置されている。この加熱プラテン68は、サンプル・ウェル14を、ホモジニアスな核酸増幅・アッセイの処理に適した

(典型的には25℃ないし75℃の)温度に予備加熱すべく作動させられる。この予備加熱段階は、空のサンプル・ウェル14が加熱プラテン68の温度と略々等しい温度に平衡するに十分な時間だけ行われる。これが行われた後、図7の(B)に示されたように、毛管室54内にピペット66を用いて液体状の生物学的試料60が導入される。これは、図7の(B)に示された如く、ピペット66の開放端を間隙58の直上に位置させて行い、次に、間隙58内に液体試料60を直接的に供給するのが好ましい。

【0032】液体試料60が毛管室54を満たした後、ピペット66が引出されると共にサンプル・ウェル14には密封体18が載置される。液体状の生物学的試料60は乾燥スポット56内の核酸増幅およびアッセイ用の乾燥試薬を再び水和し、試料60が毛管室54内に収納されている間、ホモジニアスな増幅およびアッセイ反応が生ずる。この点、毛管室54は高さが小さく且つ液体状の生物学的試料60が接触する大きな表面積を有していることから、試料60はチャンバ54内にピペットで入れられてから数秒以内にDNA増幅に必要な最適温度にまで加熱される。従って、乾燥試薬56が液体状の生物学的試料60の全体に互り溶解しかつ拡散してDNA増幅の「準備(priming)」が始まる時点までには、試薬は既に最適な温度に達している。この様にして、DNA増幅反応の「ホットスタート」が達成される。この「ホットスタート」が起きた後、加熱プラテン68は、液体状の生物学的試料60をホモジニアスな増幅およびアッセイ反応に適した(典型的には25℃ないし75℃の)温度に保持し続ける。ホモジニアスな増幅およびアッセイ反応が生ずるとき、その進行状況は適当な光学検出装置(optical detection apparatus)70によりリアルタイムで監視される。該装置70は、アッセイ反応の性質に応じて、液体状の生物学的試料60の蛍光偏光、蛍光エネルギー移動、吸光度、および、その他の光学的な応答もしくは特性を検出する。この目的の為に使用される、マイクロプレート蛍光計(microplate fluorometers)などの種々のタイプの装置70は当業界で公知であることから、詳細な説明は不要である。この点に関し、アッセイが蛍光偏光タイプであるときに採用され得る特殊な検出方法を記述したものと、上述した係属中の米国特許出願第08/527,253号をここに引用する。

【0033】サンプル・ウェル・組立体22が蛍光偏光アッセイを行うべく使用される場合、光学的窓部材20は偏光の透過を阻害しない透明材料で作るのが好ましい。斯かる材料の例としては、酢酸酪酸セルロース(CAB; cellulose acetate butyrate)、トリアセートセルロース(TAC)、および、ガラスがある。偏光はこれらの材料を通過し、その偏り(polarization)を維持する。所望であれば、サンプル・ウェル・組立体22は上記米国係属特願第08/527,253号に記述された共焦点(con

focal)偏光検出法に使用されるべき構造のものとするのが可能である。この方法においては、励起ビーム(excitation beam)の偏光子が、試料から放射される蛍光の偏光子としても使用される。これにより、測定機器内に偏光要素(polarizing elements)を配備する必要がなくなり、標準的なマイクロプレート蛍光計を蛍光偏光アッセイに使用することが可能となる。一方、共焦点法を採用する為に、光学的窓部材20は偏光材料(light-polarizing material)で作られ、検出装置70からの励起ビームと、液体状の生物学的試料60から放射された蛍光との両者を偏光させる役割を果たす。偏光材料の例としては、ポリビニルアルコール(PVA)などの偏光重合体フィルム(polarizing polymeric film)がCAB、TACもしくはガラスの間に層状すなわち「サンドイッチ」状に介設されたものがある。

【0034】好ましい実施形態において、乾燥試薬スポット56が、DNA増幅用試薬およびホモジニアスなDNAアッセイに用いられる試薬の両者を含み、後者は蛍光偏光アッセイ試薬から成るのが好ましい。適切なDNA増幅用試薬およびDNA蛍光偏光アッセイ用試薬の例は、「核酸増幅の蛍光偏光検出」と称されると共に、G. Terrance Walkerほかにより1995年9月23日に出願された係属中の米国特許出願第08/311,474号に開示されており、該出願の内容を本明細書の一部として引用する。又、乾燥スポット56内の化学試薬は、トレハロースもしくは他の炭水化物などの溶け易いマトリックス内に担持される。これらの試薬は、毛管室54内に導入された水溶液試料にさらされたときに自然に再懸濁する。所望であれば、毛管室54内に一個以上の乾燥試薬スポット56を設け、例えば一方のスポットには増幅試薬を配備し他方のスポットにはアッセイ試薬を配備し得ることが理解されよう。但し、ホモジニアスなDNA増幅・アッセイの場合には、(もし分離されていれば)試薬スポットは液体状の生物学的試料60により本質的に同時に溶解される如く位置せしめねばならない。

【0035】上記の実施形態は本発明を例示しただけのものであって、本発明がこれらに限定されると解釈してはならず、当業者には本発明を取入れた多くの代替的な装置および方法が自明であろう。従って、本発明は、その均等物をも包含する前記特許請求の範囲により定義される。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の好ましい実施形態に従って構成された一連のサンプル・ウェル・組立体を協働して形成する、DNAサンプル・ウェル8個の連結体および該サンプル・ウェルを閉塞する為の密封体8個の連結体を示す分解図である。

【図2】(A)はDNAサンプル・ウェルの連結体の平面図であり、(B)はその側断面図であり、(C)はその底面図である。

【図3】(A)はDNAサンプル・ウェル用の密封体連結体の平面図であり、(B)はその側断面図であり、(C)はその底面図である。

【図4】(A)は一個のDNAサンプル・ウェル・組立体の分解図であり、(B)はその組立状態図である。

【図5】(A)は光学的窓部材が取付けられた状態の一個のDNAサンプル・ウェル・組立体の分解断面図であり、(B)はその組立状態断面図である。

【図6】(A)、(B)および(C)は、部分的に組立てられたDNAサンプル・ウェル・組立体内にピペットにより液体状の生物学的試料を導入する手法を順を追って示す断面図である。

【図7】(A)、(B)および(C)は、その反応領域内に乾燥試薬が付着させられた本発明のDNAサンプル・ウェル・組立体を用いて核酸増幅およびホモジニアスな核酸蛍光偏光アッセイを行う手法を順を追って示す断面図である。

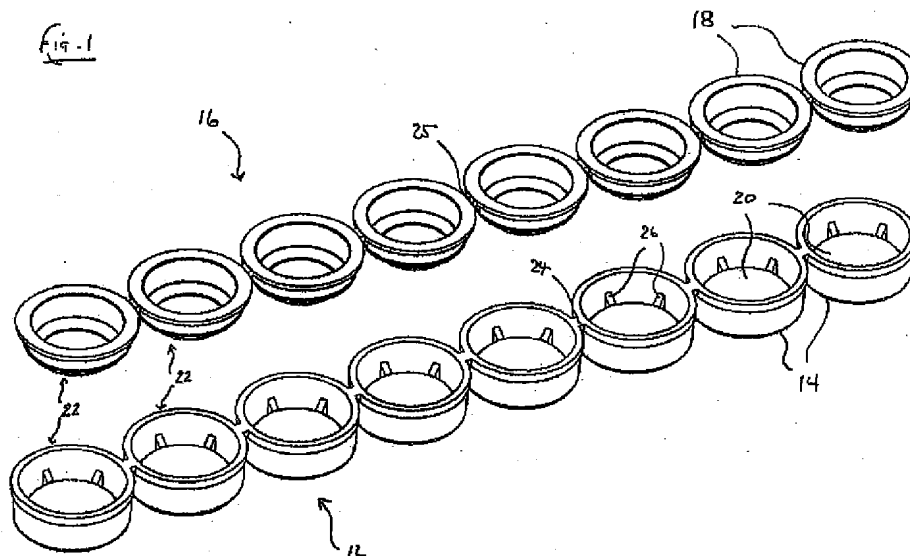
#### 【符号の説明】

- 10 マルチプル・ウェル装置
- 12 第一の連結体
- 14 サンプル・ウェル
- 16 第二の連結体
- 18 密封体
- 20 光学的窓部材
- 22 サンプル・ウェル・組立体
- 24 つなぎ片

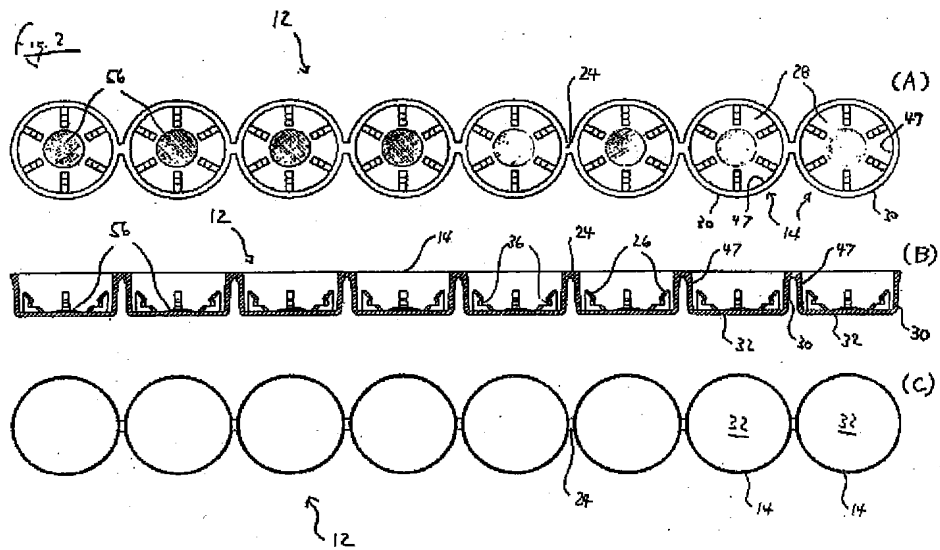
- \* 25 つなぎ片
- 26 リブ
- 28 頂部開口
- 30 円筒状側壁
- 32 円形底壁
- 36 切りかき
- 38 フランジ
- 40 円筒形側壁
- 42 中央開口部
- 10 44 円錐台状延長部
- 46 密封体リング
- 47 内側壁面
- 48 上向き面
- 50 上向き面
- 52 下向き面
- 54 毛管室
- 56 乾燥試薬
- 58 環状間隙
- 60 液体状の生物学的試料
- 20 61 外壁
- 62 下縁
- 64 上面
- 66 ピペット
- 68 加熱プラテン
- 70 光学検出装置

\*

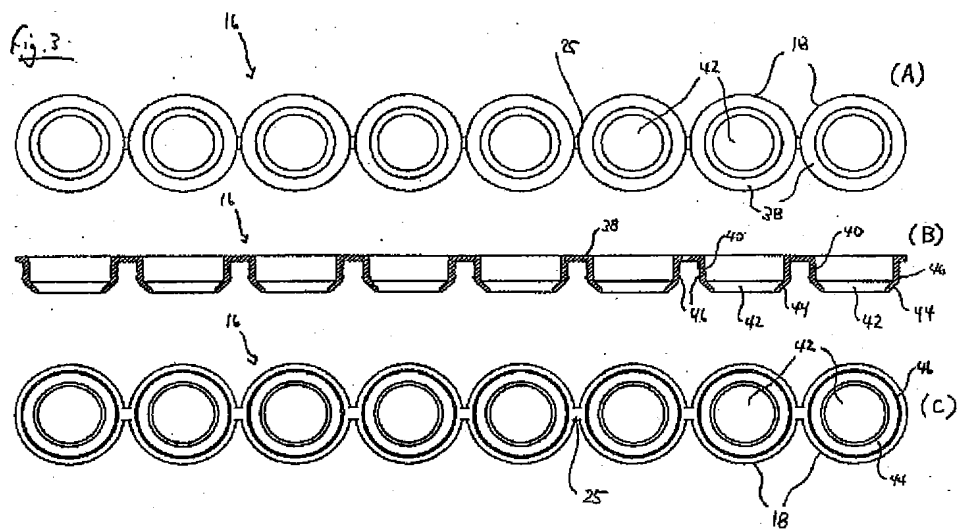
【図1】



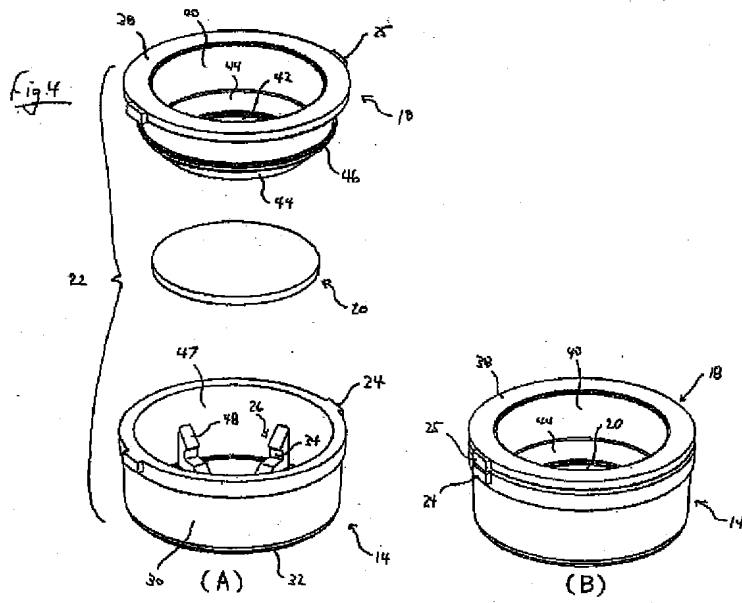
【図2】



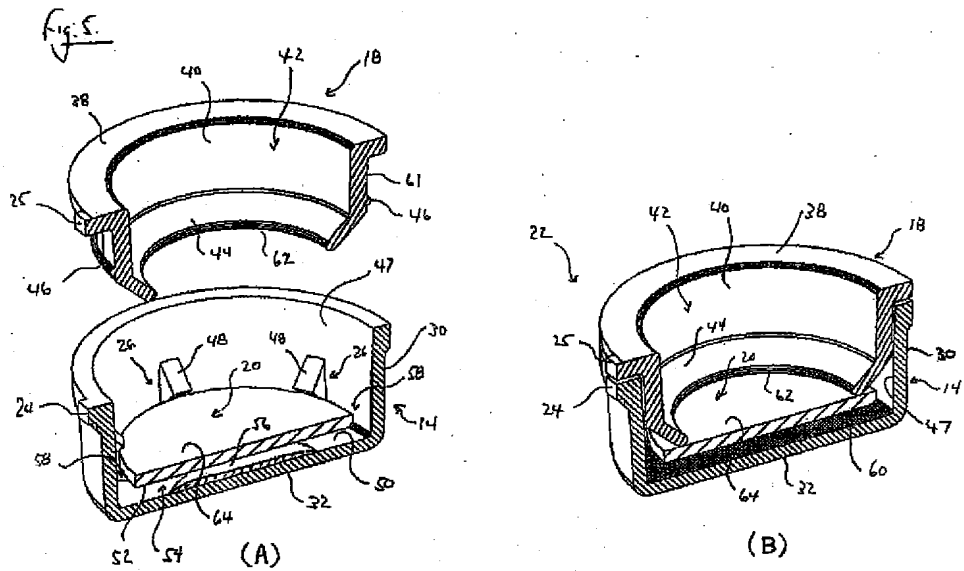
【図3】



【図4】

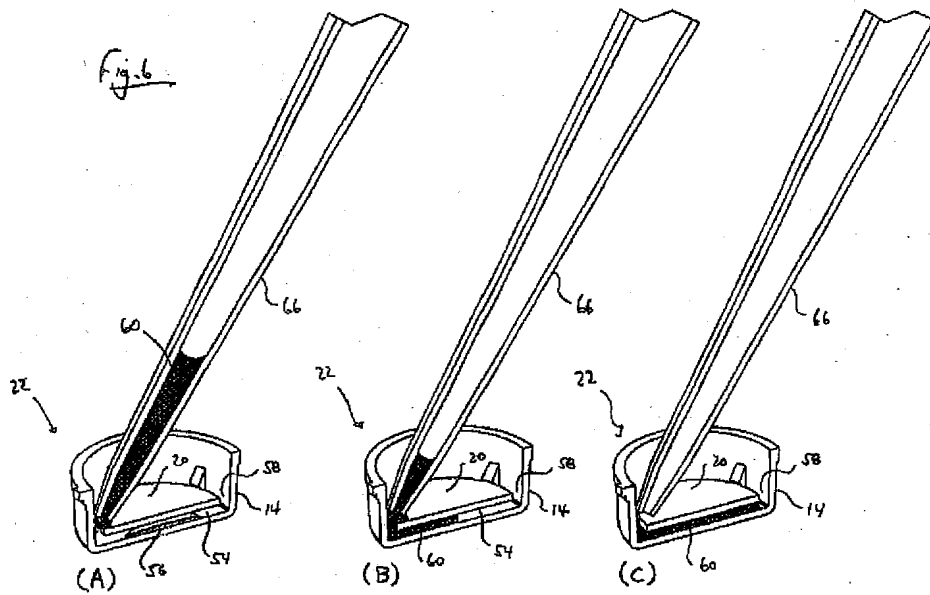


【図5】

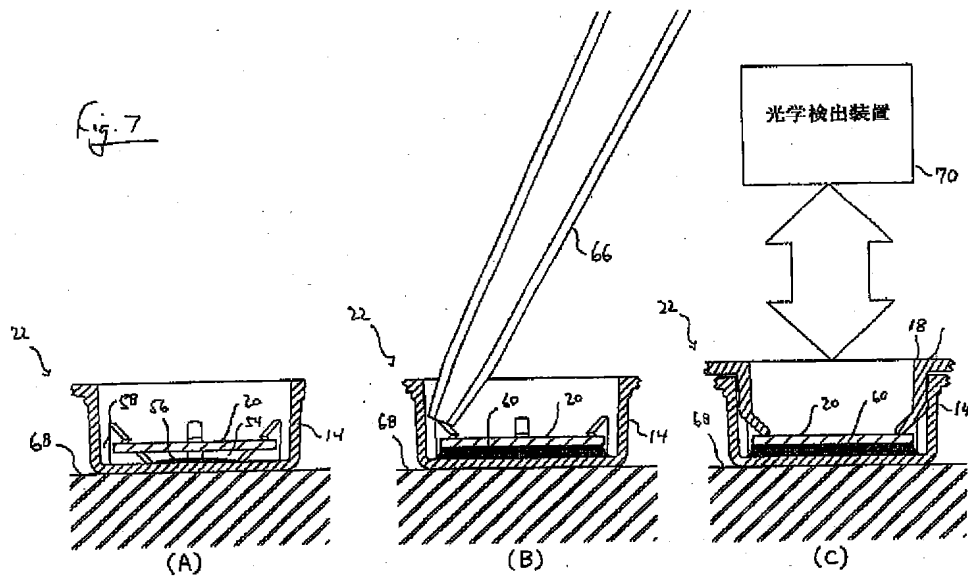




【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
// C 1 2 Q 1/68

識別記号

F I  
C 1 2 Q 1/68

A